

551,866

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/090158 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/48, C12N 15/09, 1/19, 1/21, 5/06, C12P 21/02, C07K 14/82, 16/32, G01N 33/53, 33/50, 33/15, A61K 38/47, 39/395, 45/00, 48/00, 35/00
- (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004917
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 5 日 (05.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 60/459,644 2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003) US
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社オンコレックス (ONCOREX, INC.) [JP/JP]; 〒0600063 北海道札幌市中央区南三条西10丁目1001番地5 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 正伸 (KOBAYASHI, Masanobu) [JP/JP]; 〒0060806 北海道札幌市手稲区新発寒6条4丁目2-20 Hokkaido (JP). 陳健 (JIAN, Chen) [CN/JP]; 〒0600815 北海道札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学遺伝子病制御研究所内 Hokkaido (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG

(54) 発明の名称: 医薬品

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a novel compound which exhibits an anticancer activity. A screening method characterized by using serine/threonine kinase Pim-1, its partial peptide or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明は、抗癌活性を発揮する新規化合物をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。本発明のスクリーニング方法は、セリン/スレオニンキナーゼ Pim-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/090158 A1

明 細 書

医 薬 品

5 技術分野

本発明は、癌の治療・予防剤のスクリーニング方法等に関し、更に詳細には、抗癌剤が効かなくなった癌細胞や固形癌に対しても有効な癌の治療・予防剤をスクリーニングする方法に関する。

10 背景技術

現在、臨床的に用いられている抗癌剤としては多くの種類のものが知られている。このような臨床的に用いられている抗癌剤の多くがかかえる問題点としては、いったんは効果のあった抗癌剤が効かなくなるという獲得耐性癌細胞が出現したり、固形癌に効きにくいということがある。

15 抗癌剤が固形癌に効きにくくなるのは、固形癌が一定以上の大きさになるとその内部が低酸素状態となることが原因と考えられている。

進行性の癌においては、癌細胞内部の増殖速度が周囲の細胞よりも速いため、新しく生成された血管の供給が足りず、血液の供給が不十分となり、低酸素状態となると考えられる。例えば、Teicher, B.A.

20 Hypoxia and drug resistance. Cancer Metastasis Rev., 13:139-168, 1994、Brown, J.M. & Giaccia, A.J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. Cancer Res., 58:1408-1416, 1998、Brown, J.M. Exploiting the hypoxic
25 cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. Mol. Med. Today, 6:157-162, 2000、Luk, C.K.,

Veinot-Drebot, L., Tjan, E. & Tannock, I.F. Effect of transient hypoxia on sensitivity to doxorubicin in human and murine cell lines. J Natl. Cancer Inst., 82:684-692, 1990、Sakata, K., Kwok, T.T., Murphy, B.J.,
5 Laderoute, K.R., Gordon, G.R., Sutherland, R.M. Hypoxia-induced drug resistance: comparison to P-glycoprotein-associated drug resistance. Br. J Cancer, 64:809-814, 1991、Sanna, K. & Rofstad, E.K. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and
10 methotrexate in human melanoma cell lines in vitro. Int. J Cancer, 58:258-262, 1994 には、低酸素状態にある癌細胞が、高い酸素状態にある癌細胞よりも、化学療法、放射線療法に対して耐性を有しており、低酸素状態が、固形癌細胞において薬剤耐性を誘導することが開示されている。上記文献に記載された結果は、低酸素
15 状態が固形癌細胞において、抗アポトーシス因子を誘導していることを示している。

一方、セリン／スレオニンキナーゼである Pim-1 は、最初はマウス白血病ウイルス (MuLV) によって引き起こされる T 細胞リンパ腫内において白血病ウイルスの挿入によってしばしば活性化される遺伝子
20 として同定されたセリン／スレオニンキナーゼである (Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. Cancer Res., 62:3387-3394,
25 2001、及び Niizeki, H., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Akakura, N., Chen, J., Wang, J., Hamada, J., Seth,

P., Katoh, H., Watanabe, H., Raz, A., Hosokawa, M. Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. Br. J Cancer, 86:1914-1919, 2002)。また、細胞
5 質内の P i m - 1 が種々の造血細胞内においてアポトーシスを阻害するための因子として機能することが報告されている (Cuypers, H.T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E.R., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Melief, C., Berns, A. Murine leukemia virus-induced T-cell
10 lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. Cell, 37:141-150, 1984、及び Selten, G., Cuypers, H.T. & Berns, A. Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. EMBO J, 4:1793-1798, 1985)。
15 従って、P i m - 1 を不活性化できる物質があれば、固形癌、及びそれに起因する各種疾患の予防／治療に有効であるといえる。

従って、本発明においては、抗癌活性を発揮する新規化合物をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。また、本発明は、P i m - 1 を不活性化することにより、癌を予防・治療するための癌の予防・
20 治療剤のスクリーニング方法等を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、癌細胞中に多く存在するタンパク質を見出し、この知見に基づいて本発明を完成さ
25 せた。

本発明は上記知見に基づいてなされたものであり、セリン／スレオニ

ンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする、癌の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなる癌の予防・治療剤のスクリー
5 ニング用キットを提供する。

また、本発明は、上記スクリーニング方法又はスクリーニング用キットを用いて得られる癌の予防・治療剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその塩を含有
10 してなる癌の予防・治療剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩を含有してなる癌の予防・治療剤を提供する。

また、本発明は、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列よりなるポリ
15 リペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなる癌の予防・治療剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤を提供する。

20 また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする、アポトーシス誘導剤のスクリーニング方法を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤のスク
25 リーニング用キットを提供する。

また、本発明は、上記スクリーニング方法又はスクリーニング用キッ

トを用いて得られるアポトーシス誘導剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤を提供する。

- 5 また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤を提供する。

- 10 また、本発明は、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなるアポトーシス誘導剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシス誘導剤を提供する。

- 15 また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする、抗癌剤増強剤のスクリーニング方法を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなる抗癌剤増強剤のスクリーニング用キットを提供する。

- 20 また、本発明は、上記スクリーニング方法又はスクリーニング用キットを用いて得られる抗癌剤増強剤を提供する。

また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を阻害する化合物又はその塩を含有してなる抗癌剤増強剤を提供する。

- 25 また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその

塩を含有してなる抗癌剤増強剤を提供する。

また、本発明は、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなる抗癌剤増強剤を提供する。

- 5 また、本発明は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなる抗癌剤増強剤を提供する。

- 10 また、本発明は、以下の (a) 及び (b) のポリヌクレオチドと少なくとも 95% 以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドを提供する。

(a) 配列番号：4で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号：4で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な cDNA であるポリヌクレオチド；

- 15 (b) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な cDNA であるポリヌクレオチド。

- 20 また、本発明は、上記ポリヌクレオチドを含有する組換えベクターを提供する。

また、本発明は、上記発現ベクターを保持する宿主細胞を提供する。

- 25 また、本発明は、上記宿主細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、得られた培養物からポリペプチドを回収する工程を含む、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド又はその塩の製造方法を提供する。

また、本発明は、上記ポリヌクレオチド又は組換えベクターを含有してなる癌の予防・治療剤を提供する。

また、本発明は、上記ポリヌクレオチド又は組換えベクターを含有してなるアポトーシス誘導剤を提供する。

- 5 また、本発明は、上記ポリヌクレオチド又は組換えベクターを含有してなる抗癌剤増強剤を提供する。

図面の簡単な説明

- 10 図 1 は、F A C S 解析の結果を示す図である。
図 2 は、F A C S 解析の結果を示す図である。
図 3 は、F A C S 解析の結果を示す図である。
図 4 は、各種細胞を低酸素分圧下及び正常酸素分圧下で培養した際の P i m - 1 をウェスタンブロット法により検出した結果である。
- 15 図 5 は、各種細胞を低酸素分圧下及び正常酸素分圧下で培養した差異の P i m - 1 m R N A をノーザンブロット法により検出した結果である
る
図 6 は、P i m - 1 をウェスタンブロット法により検出した結果である。
る。
- 20 図 7 は、P i m - 1 をウェスタンブロット法により検出した結果である。
る。
図 8 は、形質転換細胞のタンパク質電気泳動の結果である。
図 9 は、形質転換細胞のタンパク質電気泳動の結果である。
図 10 は、F A C S 解析の結果を示す図である。
- 25 図 11 は、F A C S 解析の結果を示す図である。
図 12 は、各種細胞を投与した場合の腫瘍の大きさの変化を示すグラ

フである。

図 1 3 は、免疫組織化学染色を行った結果を示す写真である。

図 1 4 は、F A C S 解析の結果を示す図である。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について説明する。

本発明において、「セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1」（以下、本明細書において、「P i m - 1」ともいう）とは、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を有するセリン／スレオニンキナーゼ活性を有する
10 ポリペプチドである。また、P i m - 1 は、マウス白血病ウイルス（M u L V）によって引き起こされた T 細胞リンパ腫内で M u L V の挿入によって活性化される遺伝子として同定された（Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P. Hypoxia-inducible
15 factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. Cancer Res., 62:3387-3394, 2001、及び Niizeki, H., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Akakura, N., Chen, J., Wang, J., Hamada, J., Seth, P., Katoh, H., Watanabe, H., Raz, A., Hosokawa, M.
20 Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. Br. J Cancer, 86:1914-1919, 2002)。

本発明においては、P i m - 1 もしくはその部分ペプチドとは、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ
25 酸配列を含有するタンパク質を含み、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル

など)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

15 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号：1で

20 表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

25 実質的に同質の活性としては、例えば、P i m-1が有するセリン/スレオニンキナーゼ活性が挙げられる。このキナーゼ活性が同等であるも

のが好ましい。このキナーゼ活性は、例えば p 2 1 タンパク質、m y b
タンパク質等々の基質ペプチドをリン酸化する活性として測定すること
ができる。また、P i m - 1 は、後述するように、アポトーシス誘導活
性を抑制するので、このアポトーシス誘導活性の抑制効果を測定するこ
5 とによって、実質的に同質の活性か否かを判断することができる。

本発明において用いられる P i m - 1 としては、例えば、配列番号：
1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上（例えば、1 ～ 5 0 個
程度、好ましくは 1 ～ 3 0 個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列
を有するタンパク質、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列に 1 又は
10 2 個以上（例えば、1 ～ 1 0 0 個程度、好ましくは 1 ～ 3 0 個程度）の
アミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：1 で
表されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上（例えば 1 ～ 1 0 0 個程度、好
ましくは 1 ～ 3 0 個程度）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有す
るタンパク質、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以
15 上（例えば 1 ～ 1 0 0 個程度、好ましくは 1 ～ 3 0 個程度）のアミノ酸
が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有するペプチド、又はそれ
らを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質等も含まれる。上
記のアミノ酸の挿入、置換、欠失がなされている場合、その挿入、置換、
欠失の位置は、とくに限定されない。

20 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質は、C 末
端がカルボキシル基（ $-COOH$ ）、カルボキシレート（ $-COO^-$ ）、ア
ミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）の何れであってもよ
い。また、エステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n
-プロピル、イソプロピル、n-ブチル等の炭素数が 1 ～ 6 個のアルキ
25 ル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの炭素数が 3 ～ 8 個のシク
ロアルキル基、フェニル、 α -ナフチル等の炭素数が 6 ～ 1 2 個のアリ

ール基、ベンジル、フェネチル等のフェニル-アルキル基、 α -ナフチルメチル等の α -ナフチル-アルキル基、炭素数が7~14個のアラルキル基、ピバロイルオキシメチル基等が挙げられる。配列番号：1で表わされるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものであってもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が挙げられる。さらに、配列番号：1で表わされるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（ホルミル基、アセチル基等の炭素数が1~6個のアルカノイル等の炭素数が1~6個のアシル基等）で保護されているもの、生体内で切断されて生成されるN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等の炭素数が1~6個のアルカノイル基等の炭素数が1~6個のアシル基等）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質などでもよい。

本発明において用いられるP i m - 1の部分ペプチドとしては、前記したタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記したタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

本発明で用いられるP i m - 1又はその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエ

ン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩が挙げられる。本発明で用いられる P i m - 1 もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞又は組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできる。また、タンパク質をコードする DNA (例えば、配列番号: 2 で表わされる塩基配列からなる DNA) を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、公知のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等を用いて抽出を行ない、得られた抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明において用いられる P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩は合成したものを用いることができ、その合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、P A M 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-F m o c アミノエチル)フェノキシ樹脂等を挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチ

ドまたはそれらの塩を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、D C C、N、N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-（3
5 -ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、H O B t、H O O B t）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはH O B tエステルあるいはH O O B tエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 10 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N、N'-ジメチルホルムアミド、N、N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールな
15 どのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲
20 から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、
25 無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることがで

きる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。セリンの水酸基は、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（炭素数が1～6個）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される置換基等を用いることができる。また、エーテル化に適する置換基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基等が挙げられる。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチル等が用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmoc等が

用いられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕等を用いることができる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが挙げられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等を用いることが可能である。

このような酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤を添加することが有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上述した1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオール等の存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によって除去することができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、および

その保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化は公知の置換基又は公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる $P_{i,m-1}$ の部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することができる。又は、本発明で用いられる $P_{i,m-1}$ を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。

本発明で用いられる P i m - 1 をコードするポリヌクレオチドとしては、P i m - 1 をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。DNA が好ましく用いられる。DNA としては、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、上述した細胞・組織由来の c DNA、上述した細胞・組織由来の c DNA ライブラリー、合成 DNA 等が挙げられる。ライブラリーに用いられるベクターとしては、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等が用いられる。また、上述した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。本発明で用いられる P i m - 1 をコードする DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2 で表される塩基配列を有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものであってもよい。

配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列と約 50% 以上、好ましくは約 60% 以上、更に好ましくは約 70% 以上、より好ましくは約 80% 以上、特に好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA 等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、公知の方法又はそれに準じる方法に従って行うことができる。例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。

また、市販のライブラリーを使用する場合には、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 19 ~ 40 mM、好ましくは 19 ~ 20 mM で、温度が 50 ~ 70 °C、好ましくは 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が 19 mM で温度が 65 °C の場合が最も好ましい。

本発明で用いられる P i m - 1 の部分ペプチドをコードする DNA としては、上述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の c DNA、上述した細胞・組織由来の c DNA ライブラリー、合成 DNA のいずれもが用いられる。本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA の一部分を有する DNA、または配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の一部分を含有する DNA 等が挙げられる。配列番号：2 で表される塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、上述したことと同様の意味を示す。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は上述したものが用いられる。

本発明で用いられる P i m - 1、及びその部分ペプチド（本明細書において、以下、本明細書においては、これらを単に P i m - 1 ということもある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、P i m - 1 をコードする塩基配列の一部分を有する合成 DNA プライマーを用いて PCR 法によって増幅してもよく、又は適当なベクターに組み

込んだDNAをP i m-1の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutantTM-superExpress Km (宝酒造 (株))、MutantTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LAPCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。P i m-1の発現ベクターは、例えば、(1) P i m-1をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(2) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

本発明の癌の予防・治療剤のスクリーニング方法は、上述したP i m-1もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする。具体的には、本発明の予防・治療剤のスクリーニング方法は、P i m-1もしくはその部分ペプチド又はその塩と被検物質とを接触させ、P i

m-1 のリン酸化活性を測定することにより実施することができる。また、P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩と被検物質とを接触させ、P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩のアポトーシス誘導能の阻害効果を測定することにより実施することができる。

- 5 いずれの場合においても、被検物質の非存在下における活性と比較して、活性物質の存在を確認することによってスクリーニングを行う。この方法によって、アポトーシス誘導剤のスクリーニングの実施も可能である。また、P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害することにより、腫瘍の形成能を阻害することができるので、この
- 10 方法によって、抗癌剤増強剤のスクリーニングが可能である。

- 本発明のスクリーニング方法において用いられる被検試料としては、例えば、細胞抽出物、植物抽出物、精製又は粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物、遺伝子ライブラリー等が挙げられる。本発明のスクリーニング方法は、細胞内で行
- 15 ってもよいが、試験管内で行うことも可能である。

- 細胞内で行う場合、P i m-1 を生成する細胞を用いて行うことができるが、P i m-1 をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換細胞を用いることもできる。試験管内で行う場合、P i m-1 と、P i m-1 の基質ペプチドとを、適当な反応バッファ
- 20 中で混合し、そのリン酸化能を測定することによって実施する。基質ペプチドとしては、P i m-1 によってリン酸化されるペプチドであれば特に制限なく用いることができ、反応条件は従来公知のキナーゼにおいて用いられる条件でよい。

- 25 次に、上述した組換えベクターについて説明する。

P i m-1 をコードするDNAを含有する組換えベクターとしては、P

i m - 1 をコードするヌクレオチド断片（例えば、配列番号：2 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド）を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することによって製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p U C 1 8 または p U C 1 1 8 等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば p U B 1 1 0、p T P 5 または p C 1 9 4）、酵母由来のプラスミド（例えば p S H 1 9 または p S H 1 5）、 λ ファージ等のバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルス等のウイルス等の動物ウイルスの他、p A 1 - 1 1、p X T 1、p R c / C M V、p R c / R S V、p c D N A I / N e o 等が用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合は、t r p プロモーター、l a c プロモーター、r e c A プロモーター、 λ P L プロモーター、l p p プロモーター、T7 プロモーター、T3 プロモーター、araBAD プロモーター等が、宿主がバチルス属菌である場合は、S P O 1 プロモーター、p e n P プロモーター、X Y L プロモーター、H W P プロモーター、C W P プロモーター等が好ましく、宿主が枯草菌である場合は、S P O 1 プロモーター、S P O 2 プロモーター、p e n P プロモーター等が好ましく、宿主が酵母である場合は、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター等が好ましい。動物細胞を宿主として用いる場合は、S R α プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター、H S V - T K プロモーター等が好ましく用いられる。また、昆虫細胞を宿主として用いる場合はポリヘドリンプロモーター、O p 1 E 2 プロモーター等が用いられる。

組換ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、

エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー、SV40 複製オリジン（以下、SV40 orgdi と略称する場合がある）等を付加することができる。また、必要に応じて、本発明の DNA にコードされたタンパク質を他のタンパク質（例えば、グルタチオン S トランスフェラーゼおよびプロテイン A）との融合タンパク質として発現させることも可能である。このような融合タンパク質は、部位特異的プロテアーゼを使用して切断し、それぞれのタンパク質に分離することができる。

上記選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfr と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^r と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^r と略称する場合がある、G418 耐性）等があげられる。特に、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

宿主細胞としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1（*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 60 巻, 160 (1968)), JM103（*Nucleic Acids Research*, 9 巻, 309 (1981)), JA221（*Journal of Molecular Biology*, 120 巻, 517 (1978)), HB101（*Journal of Molecular Biology*, 41 巻, 459 (1969)), C600（*Genetics*, 39 巻, 440 (1954)), DH5 α および JM109 等が用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）MI114（*Gene*, 24 巻, 255 (1983)), 207-21（*Journal of Biochemistry*,

95巻, 87(1984)] およびバチルス・ブレビス等が用いられる。
酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ
5 (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) M71 およびハンセヌラ・ポリモーファ (*Hansenula polymorpha*)等が用いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*
10 の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞等が用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)等が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))
15 等が用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。哺乳動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞等が用いられる。

また、必要に応じて、宿主細胞に適したシグナル配列をコードするポリヌクレオチドを、Pim-1をコードするポリヌクレオチドの5'末端側に付加してもよい。宿主細胞としてエシェリヒア属菌を用いる場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が用いられ、宿主細胞

25

胞としてバチルス属菌を用いる場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列等が用いられ、宿主細胞として酵母を用いる場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等が用いられ、宿主細胞として動物細胞を用いる場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等のシグナル配列が用いられる。このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

上述した宿主細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、以下に記載の文献に宿主細胞を形質転換する方法が記載されている。Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 69巻, 2110(1972); Gene, 17巻, 107(1982); Molecular & General Genetics, 168巻, 111(1979); Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991); Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978); 細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル. 263-267(1995)(秀潤社発行); 及び Virology, 52巻, 456(1973)。

大腸菌等の細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入することのできる方法であれば特に限定されるものではなく、例えばカルシウムイオンを用いる方法(Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110(1972)、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入することのできる方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、動物細胞への組換えベクターの導入方法は、動物細胞にDNAを導入することのできる方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

- 5 昆虫細胞を宿主とする場合は、昆虫細胞への組換えベクターの導入方法は、昆虫細胞にDNAを導入することのできる方法であれば特に限定されず、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

- 10 遺伝子が宿主に組み込まれたか否かを確認するための方法としては、例えばPCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。次いで、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、
15 SYBR Green 液等により染色し、次いで増幅産物を1本のバンドとして検出し、形質転換されたことを確認することができる。予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出してもよい。更に、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させた後、
20 蛍光又は酵素反応を用いて増幅産物を確認する方法を用いることもできる。

本発明のスクリーニング方法は、上述した形質転換細胞を用いて行うことができる。以下、上述した形質転換細胞を用いて本発明のスクリーニング方法を行なう場合について説明する。

- 本発明のスクリーニング方法においては、上述した形質転換細胞を、
25 P i m - 1 の基質ペプチド、及び[³²P] - A T P と共に培養し、³²P の基質ペプチドへの取り込みを測定することにより、P i m - 1 のリン酸

化活性を測定する。この測定を被検物質の存在下、及び非存在下で行い、両者を比較し、スクリーニングを行う。すなわち、被検物質の存在下と、非存在下で P i m - 1 のリン酸化活性を測定し、被検物質の存在下の方が非存在下よりもリン酸化活性が低い場合は、被検物質は P i m - 1 の

5 阻害効果を有するものであることがわかる。

また、本発明のスクリーニング方法は、P i m - 1 のリン酸化活性を測定することに代え、アポトーシス誘導能を測定することによって実施することができる。すなわち、P i m - 1 はアポトーシス誘導能を阻害するので、被検物質の存在下と、非存在下でアポトーシス誘導能の阻害

10 効果を測定し、この阻害が減少すれば、被検物質は P i m - 1 の活性を阻害し、アポトーシス誘導能を有し、癌の予防・治療、抗癌剤の増強等に有効であることがわかる。

P i m - 1 は固形癌細胞内に多く存在していることから、P i m - 1 に対する阻害効果を有する化合物は癌の予防・治療効果、特に固形癌の

15 予防・治療効果を有する化合物であると考えられる。また、この癌治療効果は癌細胞の腫瘍形成能を阻害するものであり、この効果はアポトーシス誘導効果により発揮されるものである。従って、上記スクリーニング方法は、アポトーシス誘導剤をスクリーニングする方法として用いることができる。また、上記スクリーニング方法は、抗癌剤増強剤をスク

20 リーニングする方法として用いることができる。

また、本発明のスクリーニング方法は、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 の活性を促進又は阻害する物質をスクリーニングする方法であって、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプ

25 チド又はその塩と被検物質とを接触させる工程、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 のリン酸化活性を検出する工程を含む、方法である。

リン酸化活性の検出を、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 によってリン酸化される基質の結合に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出することができる。また、リン酸化活性の検出を、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 によってリン酸化される基質のリン酸化された状態を認識する抗体を用いて検出することができる。

リン酸化活性の検出を、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 によってリン酸化される基質の結合に応答して活性化するレポーター遺伝子の発現量の変化を指標として検出する場合について説明する。

10 P i m - 1 によってリン酸化される基質ペプチドの結合配列をレポーター遺伝子の発現ベクターに連結し、これを宿主細胞に導入する。また、同じ宿主細胞に、P i m - 1 を発現するベクターを導入すると、2つの発現ベクターが導入された細胞が製造される。なお、P i m - 1 を発現するベクターとしては上述したものが用いられる。

15 また、上記レポーター遺伝子の発現ベクターは、P i m - 1 を発現するベクターと同様にして製造することができ、宿主細胞としては、上述したものを特に制限なく用いることができる。

本発明において用いられる、P i m - 1 によってリン酸化される基質ペプチドとしては、リン酸化されることによって結合配列に結合するものである。このような基質ペプチドとしては、例えば c - M y b 、
20 Nuclear Factor Activating (NFAT) 及び P 2 1 等が挙げられる例えば、c - m y b はリン酸化されると、結合配列に結合し、レポーター遺伝子が発現され、そのレポーター遺伝子の発現を検出することにより、c - m y b がリン酸化されたか否かが検出される。

25 レポーター遺伝子としては、特に限定されないが、安定でかつ活性の定量が容易なものが好ましい。このようなレポーター遺伝子としては、

例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、HIS3遺伝子、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP) 等をコードするDNAが挙げられるが、これらに限定されない。レポーター遺伝子は、遺伝子本来のプロモータを有するものであってもよいし、プロモータ部分が他の遺伝子由来のものと置換されたものを用いてもよい。レポータ遺伝子は、応答配列の下流に機能的に連結されていればよい。

すなわち、上述したスクリーニング方法においては、被検物質が P_{im-1} を阻害する活性を有している場合、レポーター遺伝子の発現が抑制又は阻害されるので、そのレポーター遺伝子の発現を検出することにより、被検物質が P_{im-1} の活性を促進又は阻害するか否かを検出することが可能となる。

次に、リン酸化活性の検出を、セリン/スレオニンキナーゼ P_{im-1} によってリン酸化される基質のリン酸化された状態を認識する抗体を用いて検出する場合について説明する。

抗体を用いる場合、例えば、 P_{im-1} によってリン酸化される基質のリン酸化された状態を認識する抗体（一次抗体）をプレートに固相化させる。これとは別に、 P_{im-1} と P_{im-1} によってリン酸化される基質ペプチドとを、被検物質の存在下又は非存在下に緩衝液中で混合し、通常は2～4時間インキュベートしておく。この操作により、基質ペプチドは P_{im-1} によってリン酸化される。次いで、この基質ペプチドを含む緩衝液をプレートの穴に入れ、一定時間インキュベーションする。この操作により、リン酸化された基質ペプチドは一次抗体と結合し、リン酸化されていない基質ペプチドは一次抗体と結合しない。

リン酸化された基質ペプチドは一次抗体と結合しているので、次いで

、基質ペプチドに対する別の抗体（二次抗体）との結合を調べることに
より、基質ペプチドがリン酸化されているか否かを調べることができる
。

二次抗体の結合の検出には、例えば、放射性同位元素を結合したもの
5 を用いた場合、液体シンチレーション等を用いて検出する。二次抗体に
酵素を結合したものを用いる場合には、基質の酵素的変化、例えば発色
の程度を吸光度計により検出する。また、二次抗体に蛍光物質を結合し
たものを用いる場合には、蛍光光度計により検出する。これらの結果を
、被検物質の存在下の場合と非存在下の場合とを比較することにより、
10 被検物質が P i m - 1 のリン酸化活性を促進するか阻害するかを調べる
ことができる。

用いられる基質としては、例えば、P 2 1 タンパク質等が挙げられる
。

なお、用いる抗体としては、リン酸化された基質タンパク質、又はリ
15 ン酸化されていない基質タンパク質を認識し得る抗体であれば、ポリク
ローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。該抗体は、
例えば P 2 1 タンパク質（リン酸化されているもの、及びされていない
もの）を抗原として用い、従来公知の抗体または抗血清の製造法に従っ
て製造することができる。

20

次に、本発明のスクリーニング用キットについて説明する。

本発明のスクリーニング用キットは、P i m - 1 もしくはその部分ペ
プチド又はその塩を含有する。本発明のスクリーニング用キットは、P
i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物
25 をスクリーニングするために用いられる。

本発明のスクリーニング用キットには、P i m - 1 もしくはその部分

ペプチド又はその塩、P i m-1の基質ペプチド、該基質ペプチドをリン酸化するためのリン酸基供与体を含むことが好ましい。

また、本発明のスクリーニング用キットは、上述した、発現ベクター、又は形質転換体を含む。発現ベクター、又は形質転換対を含む
5 スクリーニング用キットにおいても、P i m-1の基質ペプチド、該基質ペプチドをリン酸化するためのリン酸基供与体を含むことが好ましい。これらのスクリーニング用キットを用いることにより、上記スクリーニング方法を実施することができる。

10 P i m-1の活性を阻害する化合物は、アポトーシスを誘導する薬剤の候補となり、癌の治療・予防への応用、抗癌剤の増強剤としての応用が考えられる。

本発明の癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、抗癌剤増強剤は、P i m-1もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物
15 物またはその塩を含む。P i m-1もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物またはその塩は、上記スクリーニング方法又はスクリーニング用キットを用いて検索することができる。

P i m-1の活性を阻害する化合物の具体例としては、例えば配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは
20 実質的に同一のアミノ酸配列よりなるポリペプチドがx挙げられる。配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するP i m-1のキナーゼ活性ドメインを欠失したポリペプチドであり、配列番号：1の1～80番目のアミノ酸残基を欠失したポリペプチドである。配列番号：3で表わされ
25 るアミノ酸配列を有するポリペプチドは、キナーゼ活性ドメインを欠失したポリペプチドであり、このポリペプチドが存在すると、P i m-1

の活性が阻害され、その結果、このポリペプチドは癌治療・予防剤、アポトーシス誘導剤、抗癌剤増強剤として用いることができる。また、P i m - 1 の活性を阻害する化合物としては、P i m - 1 に対する抗体が挙げられる。また、P i m - 1 の活性を阻害する化合物としては、P i m - 1 をコードする遺伝子、すなわち配列番号：2 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドに対する二本鎖RNA（以下、本明細書において siRNA ともいう）、アンチセンスヌクレオチドが挙げられる。また、二本鎖RNAとしては、21～23塩基対の short interference RNA が好ましい。

- 10 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一なポリペプチドは、合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 20 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドとしては、例えば、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列中の1又は2個以上（例えば、1～50個程度、好ましくは1～30個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列に1又は2個以上（例えば、1～100個程度、好ましくは1～30個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に1又は2個以上（例え
25 ば1～100個程度、好ましくは1～30個程度）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号：1 で表されるアミノ

酸配列中の1又は2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有するペプチド、又はそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質等も含まれる。上記のアミノ酸の挿入、置換、欠失がなされている場合、その挿入、置換、欠失の位置は、とくに限定されない。

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。また、エステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、

n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル等の炭素数が1～6個のアルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの炭素数が3～8個のシクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチル等の炭素数が6～12個のアリール基、ベンジル、フェネチル等のフェニル-アルキル基、 α -ナフチルメチル等の α -ナフチル-アルキル基、炭素数が7～14個のアラ

ルキル基、ピバロイルオキシメチル基等が挙げられる。配列番号：1で表わされるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものであってもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が挙げられる。さらに、配列番号：3

で表わされるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（ホルミル基、アセチル基等の炭素数が1～6個のアルカノイル等の炭素数が1～6個のアシル基等）で保護されているもの、生体内で切断されて生成されるN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（ $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等の炭素数が1

～6個のアルカノイル基等の炭素数が1～6個のアシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質などでもよい。

5 配列番号：3で表されるアミノ酸配列よりなるポリペプチドは、塩の形態であってもよく、このような塩としては、P i m - 1について説明したものと同様である。

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドは、公知のペプチド合成法によって合成することもできる。ペプチド合成については、P i m - 1について説明した方法と同様な方法が挙げられる。

10 また、上述したP i m - 1を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドは、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドをコードするDNA（例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列からなるDNA）を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。

15 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：4で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNAであれば何れのものであってもよい。

20 配列番号：4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、更に好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有す

るDNA等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、上述した方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、上述した通りである。

- 5 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドをコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅してもよく、又は適当なベクターに組み込んだDNAを配列番号：3で表わ
- 10 されるアミノ酸配列よりなるポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、上述した通りである。DNAの塩基配列の変換についても、上述した通りである。
- 15 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチド、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する組換えベクターは、上記ポリヌクレオチド断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することによって製造することができる。ベクター及びプロモーターは、上述したものが用いられる。
- 20 組換えベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカ、SV40複製オリジン（以下、SV40orgdiと略称する場合がある）等を付加することができる。また、必要に応じて、本発明のDNAにコードされたタンパク質を他のタンパク質（例えば、グルタチ
- 25 オンSトランスフェラーゼおよびプロテインA）との融合タンパク質として発現させることも可能である。このような融合タンパク質は、部位

特異的プロテアーゼを使用して切断し、それぞれのタンパク質に分離することができる。

上述した組換えベクターを宿主細胞に形質転換する方法については上述した通りである。また、宿主細胞としては、上述したものをを用いることができる。

上述した宿主細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。この方法については上述した通りである。

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド又はその塩は、上記宿主細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、得られた培養物からポリペプチドを回収する工程を含む。

具体的には、上述した宿主細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせることによる公知のタンパク質の精製方法によって実施することができる。

得られたポリペプチドが遊離体である場合には、公知の方法によって適当な塩に変換することができる。また、塩として得られた場合には、公知の方法によって遊離体又は他の塩に変換することができる。

本発明の、上記配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なcDNAであるポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクターは、癌の予防・治療剤、アポトーシス誘導剤、及び抗癌剤増強剤として用いることができる。

例えば、癌の患者等に対して、(イ)上記ポリヌクレオチドを標的細

胞内で機能し得るプロモーターの制御下においた発現ベクターを該患者に投与して生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、

(ロ) 取り出した細胞に本発明のポリヌクレオチドを上記と同様に導入し、上記ポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植すること

5 によって、上記効果を発揮させる。上記リヌクレオチドを上記目的に使用する場合は、該ポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与してもよい。

10

配列番号：2で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドに対する二本鎖RNAは、同じ配列を有する遺伝子の発現を抑制し、従って、配列番号：2で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドの発現を抑制するため、P i m-1の発現が抑制され、P i m-1の活性を阻害

15 することができる。このような二本鎖RNAとしては、21~23塩基対の short interference RNAが好ましい。二本鎖RNAの調製法としては、従来公知の方法を特に制限なく用いることができ、例えば、Silencer si RNA construction kit (A m b i o n社製)を用いて製造することができる。

20

配列番号：2で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドに対する二本鎖RNAとしては、例えば、配列番号：9で表わされる配列からなるポリヌクレオチド (5'-aaugaugaagucgaagagaucuccugucuc-3') と、配列番号：10で表わされる配列からなるポリヌクレオチド (5'-aagaucucuucgacuucacaccugucuc-3') とからなる二本鎖RNA、配

25 列番号：11で表わされる配列からなるポリヌクレオチド (5'-aaaucuaaugagaugcugacaccugucuc-3') と、配列番号：12で表わさ

れる配列からなるポリヌクレオチド
(5'-aaugucagcaucucauuagauccugucuc-3') とからなる二本鎖RNA、配
列番号：13で表わされる配列からなるポリヌクレオチド
(5'-aaauccaugggaugguucuggaccugucuc-3') と、配列番号：14で表わさ
5 れる配列からなるポリヌクレオチド
(5'-aauccagaaccauccauggauccugucuc-3') とからなる二本鎖RNAが挙
げられる。

上述した、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペ
プチド等の、Pim-1の活性を阻害する化合物は、そのままで、あるい
10 は摂取促進のための補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤
化し、投与できる。上記ポリペプチドを癌の予防・治療、アポトーシス
誘導、又は抗癌剤増強剤として使用する場合は、好ましくは90%、更
に好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、最も好ましくは
99%以上に精製されたポリペプチドを使用することが好ましい。上記
15 ポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、
エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいはエアロ
ゾル化して吸入剤の形で、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容
し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に
使用できる。

20 例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に許容し得る担体、香味剤、
賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤等とともに一般に認めら
れた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造す
ることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適
当な用量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤等に混和
25 することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、
トラガント、アラビアゴム等の結合剤、結晶性セルロース等の賦形剤、

コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等の膨化剤、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、シヨ糖、乳糖またはサッカリン等の甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリー等の香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂等の液状担体を含むことができる。注射剤は、本発明のポリペプチドを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等を配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

上記ポリヌクレオチドが挿入された組換えベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー等）に対して投与することができ、癌の予防・

治療剤、アポトーシス誘導剤、又は抗癌剤増強剤として用いることができる。

上記癌治療・予防剤、抗癌剤増強剤の対象となる癌としては、例えば、
膵臓癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮
5 癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍及び血液腫瘍等が挙げ
られ、また、細胞内の酸素濃度が低下している固形癌に特に有効である。

本発明の癌治療・予防剤、アポトーシス誘導剤、抗癌剤増強剤を用
いる場合、患者に直接投与する以外に、公知の製剤学的方法によって製
剤化して投与を行うことが可能である。例えば、薬理学上許容される担
10 体又は媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁
剤、界面活性剤、安定剤等と適宜組み合わせる製剤化して投与すること
ができる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注
射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉の、又は経口的に当業者に公知
の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法等によ
15 り変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能
である。

実施例

以下に、実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明
20 はこれに限定されるものではない。

実施例 1

低酸素分圧及び正常酸素分圧下における、固形癌細胞の抗癌剤に対す
る感受性を調べた。細胞としては、3種類の固形膵臓癌細胞系（P C I
－ 3 5 細胞、K M P － 4 細胞及び P C I － 4 3 細胞）を用いた。各細胞
25 2×10^3 個を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシスプラチンの存在下で低酸素分圧
下（1%酸素、5%二酸化炭素、以下、本実施例において同じ）、又は

正常酸素分圧下（20%酸素、5%二酸化炭素、以下、本実施例において同じ）で6時間培養を行った。培養を行った後、生理加リン酸バッファ（pH7.4）で2回洗浄を行い、試料を調整した。なお、培養に
5 本明細書において特に限定しない限り、同一の培地を用いるものとする）。

上記細胞について、プロピジウムヨウダイド（PI）及びFITCを結合した抗アネキシンVで染色し、FACSscalibur（Becton Dickinson 社製）でFACS解析を行った。

10 FACS解析の結果を図1に示す。図1において、Normoxiaは正常酸素分圧下を意味し、Hypoxiaは低酸素分圧下を意味する（以下、本明細書において同じ）。本実施例におけるFACS解析について説明すると、細胞は、PI及び抗アネキシンVで染色され、それぞれの染色の強弱によって分割され、図1に示すように分布する。この
15 図においては、右下段が早期アポトーシス細胞を示し、右上段が後期アポトーシス細胞を示す。また、左下段は生細胞を示す。右下段及び右上段の総計をアポトーシス細胞として、図中に割合を%で示した。以下、本明細書におけるFACS解析は同様である。

図1に示すように、3種類の固形臓器癌細胞系においては、シスプラチンの存在下、正常酸素分圧下で培養することにより、低酸素分圧下
20 比べ、約2倍のアポトーシスが誘導された。すなわち、上記3種類の固形臓器癌細胞系においては、低酸素分圧下においては、正常酸素分圧下よりもアポトーシス誘導が阻害されることがわかった。

25 実施例 2

PCI-43細胞について、実施例1と同一条件にて24時間まで培

養を行い、培養開始前、12時間培養後、及び24時間培養後の試料を用いて同様に解析を行った。結果を図2に示す。図2に示すように、時間の経過と共にシスプラチンによってアポトーシスは誘導されたが、低酸素分圧下における培養においては、正常酸素分圧下の場合の約1/2であった。

上記結果より、各種細胞は、低酸素分圧下でシスプラチンによって誘導されるアポトーシスに対して、正常酸素分圧下よりも耐性であることを示す。

10 実施例3

ゲムシタビン、アドリアマイシン及びシスプラチンを用い、細胞はP C I - 4 3細胞を用い、実施例1と同様にして測定を行った。なお、ゲムシタビン、アドリアマイシンの濃度は、それぞれ0.1~1 μ mol、0.1~5 μ molとした。測定結果から、IC50を以下のようにして算出した。

各種濃度の抗癌剤で48時間処理した後の生細胞数を測定し、各種抗癌剤を加えない場合Eの半分の生細胞数になる抗癌剤の濃度をIC50とした。結果を表1に示す。

20 表1

	I C 5 0 (μ M)		
	ゲムシタビン	アドリアマイシン	シスプラチン
正常酸素	0 . 2 7 2	0 . 3	1 8 . 6 1 4
低酸素	1 . 5 6 5	1 . 9	2 7 . 7 4 2

表1に示すように、ゲムシタビン及びアドリアマイシンによる50%アポトーシス誘導には、シスプラチンと同様、低酸素分圧下の方が、ゲムシタビン、アドリアマイシンともに正常酸素状態よりも高濃度の抗癌

剤が必要であった。

実施例 4

5 P C I - 4 3 細胞について、シスプラチンに代え、抗Fas抗体 2 μ g /
m l を用いた以外は、実施例 1 と同様に培養を行い、解析を行った。解
析は培養開始前及び 2 4 時間培養後に行った。結果を図 3 に示す。

図 3 に示すように、P C I - 4 3 細胞は、低酸素分圧下で抗Fas抗体に
よって誘導されるアポトーシスに対して、正常酸素分圧下よりも感受性
を示すことがわかった。

10

実施例 5

各種の癌細胞を、低酸素分圧及び正常酸素分圧下で 1 6 時間培養し、
それぞれの細胞内における P i m - 1 タンパク質、及び P i m - 1 m R
N A の解析を行った。

15 用いた細胞は、H C T 1 1 6 (大腸癌細胞株)、H e P G 2 (肝癌細胞
株)、K M P - 4 (膵臓癌細胞株)、P C I - 1 0 (膵臓癌細胞株)
、P C I - 3 5 (膵臓癌細胞株) 及び P C I - 4 3 (膵臓癌細胞株) で
ある。各細胞を、低酸素分圧下 (1 % 酸素、5 % 二酸化炭素)、又は正
常酸素分圧下 (2 0 % 酸素、5 % 二酸化炭素) で 1 6 時間培養を行った
20 。培養が終了した細胞について、Trizol 試薬を用いて RNA 抽出を行い、蛋
白抽出は 1 % NP-40 lysis buffer (50uM Tris PH 7.5, 150nM NaCl, 2
uM EDTA, 1uM EGTA, 50uM NaF, 1uM Na3VO4, 1uM PMSF) を用いて行っ
た。

タンパク質の検出はウェスタンブロットにより行った。すなわち、上
25 記試料を 1 2 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロー
ス膜に転写した。膜をブロッキングバッファー (5 % スキムミルク、生

理加 T w e e n - リン酸バッファー中) でブロッキングし、抗 P i m - 1 抗体と 1 時間反応し、次いで、ペロオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス I g G 二次抗体でインキュベートし、E C L 検出キット (A m e r s h a m) で発色させた。

- 5 結果を図 4 に示す。図 4 は、各種細胞を低酸素分圧下及び正常酸素分圧下で培養した際の P i m - 1 をウェスタンブロット法により検出した結果である。図 4 において、N は正常酸素分圧下、H は低酸素分圧下による培養を行った試験結果である。図 4 に示すように、試験を行った細胞株全てにおいて、P i m - 1 は、正常酸素分圧下で培養した場合よりも、低酸素分圧下で培養した方が P i m - 1 の量が多いことがわかる。

次いで、ノーザンブロット解析を行い、各種細胞における P i m - 1 m R N A の検出を行った。P i m - 1 検出用の c D N A フラグメントを R T - P C R で増幅し、ノーザンブロット解析用プローブとして用いた。P C R プライマーとしては以下のものを用いた。

- 15 p i m - 1 フォワード: 5' - G G T T G G A T G C T C T T G T C C A A - 3' (配列番号: 5)

リバーズ: 5' - C C T T C C A G A A G T C T T C T A T - 3' (配列番号: 6)

- 結果を図 5 に示す。図 5 は、各種細胞を低酸素分圧下及び正常酸素分圧下で培養した差異の P i m - 1 m R N A をノーザンブロット法により検出した結果である。また、図 5 の下部に示すグラフは、上部のウェスタンブロットによる解析結果をスキャナーで読みとり、その強度比を示すものである。図 5 に示すように、試験を行った細胞株全てにおいて、P i m - 1 m R N A は、正常酸素分圧下で培養した場合よりも、低酸素分圧下で培養した方が P i m - 1 m R N A 量が多いことがわかる。
- 25 。

上記結果より、癌細胞においては、正常酸素分圧下よりも低酸素分圧

下で培養した場合に、P i m - 1 が大量に生産されることがわかる。

実施例 6

各種腫瘍細胞を低酸素分圧下に曝した場合の P i m - 1 タンパク質
5 の発現を時間経過を追って観察した。細胞としては、H C T 1 1 6、P
C I - 1 0 及び P C I - 4 3 を用いた。培養開始前、低酸素分圧下に細胞
を曝して 2 時間経過後、4 時間経過後に細胞をサンプリングし、実施
例 5 と同様に操作を行い、ウェスタンブロット解析を行った。結果を図
6 に示す。図 6 において、 β -actin は、発色のコントロールとして用い
10 たものである。図 6 に示すように、用いた 3 種類の細胞全てにおいて、
低酸素分圧下に曝してからの時間の経過とともに P i m - 1 の量が増加
していることがわかった。

実施例 7

15 正常酸素分圧下において、P i m - 1 がプロテアーゼによって分解さ
れているか否かを調べた。P C I - 4 3 細胞を、低酸素分圧下、及び正
常酸素分圧下にて培養した。低酸素分圧下で培養した細胞については、
培養前、培養開始 4 時間、1 2 時間及び 2 4 時間経過後にサンプリング
し、実施例 5 と同様に操作を行い、ウェスタンブロット解析を行った。
20 また、正常酸素分圧下における培養においては、培地中にプロテアソー
ム阻害剤である N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal (ALLN
) を 5 0 μ M 濃度加えて培養を行った。正常酸素分圧下における培養に
おいては、培養開始前、培養開始 6 時間、及び 1 2 時間経過後にサン
プリングし、実施例 5 と同様に操作を行い、ウェスタンブロット解析を行
25 った。結果を図 7 に示す。図 7 に示すように、低酸素分圧下における培
養においては、低酸素分圧に曝してからの時間経過に伴い、P i m - 1

の量が増加しており、正常酸素分圧下においても時間経過に伴い P i m - 1 の量が増加していた。これは、プロテアソーム阻害剤のない状況においては、P i m - 1 タンパク質が分解されていることを示す。

5 実施例 8

PCI-43 細胞を、プロテアソーム阻害剤である ALLN の存在下、正常酸素分圧下にて培養した。培養を 6 時間行い、サンプリングし、ユビキチンを免疫沈降させた後、ウェスタンブロット法により解析を行った。一次抗体として、抗ユビキチン抗体、及び抗 P i m - 1 抗体を用
10 いる以外は実施例 5 と同様に操作を行った。ALLN の濃度は、0、50 及び 100 μ M で行った。結果を図 8 に示す。図 8 において、左側は一次抗体として抗 P i m - 1 を用いた結果であり、右側は一次抗体として抗ユビキチンを用いた結果である。図 8 に示すように、サンプルは抗 P i m - 1 抗体と反応することから、免疫沈降したユビキチンに P i m
15 - 1 が結合していることがわかる。すなわち、P i m - 1 は、最初ユビキチン化され、プロテアソームがユビキチンを指標としてプロテアソームによって P i m - 1 が分解されることがわかった。

実施例 9

20 実施例 1 ～ 3 で、癌細胞中で低酸素分圧下において各種抗癌剤によって誘導されるアポトーシス誘導能が低下することが明らかとなった。また、実施例 4 において、低酸素分圧下で培養した癌細胞中に P i m - 1 が大量に存在することが明らかになったので、P i m - 1 の役割りを明らかにするため、ドミナントネガティブ P i m - 1 トランスフェクタン
25 トを確立した。P i m - 1 トランスフェクタントは、野生型 P i m - 1 のキナーゼ活性ドメインを欠如したペプチド、すなわち配列番号：3 で

表わされるペプチドを生産するものである。

キナーゼ活性ドメインを欠失した、ドミナントネガティブ P i m - 1 の c D N A は、P C I - 1 0 細胞から精製された m R N A の R T 生成物から増幅し、P C R 4 - T O P O 中にクローニングした。プラスミドの
5 配列決定は、A B I 3 7 7 自動化配列決定装置 (Applied Biosystems) を用い、DyeDeoxy Terminator kit (Perkin-Elmer) を用いて行った。クローニングされたフラグメント (Invitrogen) に結合した。なお、R T - P C R の方法を以下に簡単に説明する。

7 5 m M K C l 、 5 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 3) 、 3 m
10 M M g C l 2 、 1 0 m M ジチオスレイトール、0 . 5 m M 各 d N T P 、 2 μ M ランダムプライマー、及び 1 0 0 0 U A M L V リバー
ストランスクリプターゼ (G i b c o B R L) を含む反応混合物中で
3 7 ° C 、 1 時間インキュベーションすることにより、各 R N A 試料 (5
μ g) から c D N A の増幅を行った。c D N A の P C R 増幅は、5 0
15 m M K C l 、 1 0 m M T r i s - H C l (p H 9 . 0) 、 2 . 5 m M
M g C l 2 、 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 2 0 0 μ M 各 d N T P 、 1 0 μ M 各特異的プライマー、及び 1 U の T a q ポリメラーゼ
(Gibco BrL) を含む反応混合物中で行った。P C R は、D N A サーマル
サイクラー (Barnstead/Thermolyne) 中で、3 5 サイクル (9 4 ° C 、 1
20 分、6 0 ° C 、 1 分、7 2 ° C 、 2 分) 行った。

P C R プライマーとしては以下のものを用いた。

d n p i m - 1 フォワード : 5 ' -
GTAGAATTCCGCCACCATGCCTGCCTAATGGCACTCGAGTG - 3 ' (配列番号 : 7)
リバーズ : 5 ' - GTACTATTTGCTGGGCCCCGGCGAC - 3 ' (配列番号 : 8)

25 得られたベクターを、P C I - 4 3 細胞に、リポフェクタミン (Life Technologies) を用いて発現ベクターに形質導入した。トランスフェク

タントを、 $1, 200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G-418 で選択した後、限界希釈法でクローニングし、ドミナントネガティブトランスフェクタント dnp3、dnp4 及び dnp10 を得た。次いで、トランスフェクタントを $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G-418 の存在下、維持した。

- 5 得られた形質転換細胞について、タンパク質の電気泳動を行った。試料の調製は、1% NP-40 lysis buffer ($50 \mu\text{M}$ Tris PH 7.5, 150 nM NaCl, $2 \mu\text{M}$ EDTA, $1 \mu\text{M}$ EGTA, $50 \mu\text{M}$ NaF, $1 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 , $1 \mu\text{M}$ PMSF) を用いておこなった。

コントロールとして、ベクターを形質転換したものについても行った。

- 10 結果を図 9 に示す。図 9 は、形質転換細胞のタンパク質電気泳動の結果である。図 9 に示すように、dnp3、dnp4 及び dnp10 は、キナーゼドメインを欠失した Pim-1 の存在を表すピークが検出された (図 9 における dnPim-1)。ベクターのみを形質転換したもの (v3 及び v4) については、このピークは検出されなかった。

15

実施例 10

実施例 9 で得られた dnp3、dnp4、dnp10 及びベクターのみを形質転換した細胞 v3 について、実施例 1 と同様にしてアポトーシス誘導能を測定した。結果を図 10 に示す。

- 20 図 10 に示すように、v3 については、シスプラチンの存在下、正常酸素分圧下で培養することにより、低酸素分圧下に比べ、約 2 倍のアポトーシスが誘導された。これに対し、ドミナントネガティブ Pim-1 である dnp3、dnp4 及び dnp10 については、正常酸素分圧下及び低酸素分圧下において差は認められなかった。

25

実施例 11

シスプラチンに代え、抗Fas抗体 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた以外は、実施例 1 と同様に培養を行い、解析を行った。解析は培養開始前及び 24 時間培養後に行った。結果を図 11 に示す。

図 11 に示すように、v3、dnp3、dnp4及びdnp10について低酸素分圧下及び正常酸素分圧下において、抗Fas抗体によって誘導されるアポトーシスに対して、感受性は等しかった。

実施例 9 及び実施例 10 の結果から、Pim-1 の機能を阻害することによって、抗癌剤により誘導されるアポトーシスに対する感受性は回復するが、低酸素状態で抗 Fas 抗体によって誘導されるアポトーシスに対する感受性を回復せず、このことは、Pim-1 が膵臓癌細胞において抗癌剤に対する耐性と相関があることを示す。

実施例 12

SCIDマウスの右脇腹に、V3、dnp3、dnp4 及び dnp10 を、それぞれ 5×10^6 個ずつ皮下注射した。皮下注射後、3 日毎に 21 日目まで腫瘍の大きさを観察した。腫瘍の大きさの測定は腫瘍の大きさの測定は短径及び長径をノギスを用いて測定し、以下の計算式にて体積を算出し、腫瘍の大きさとした。

$$(\text{短径}) \times (\text{短径}) \times (\text{長径}) / 2$$

結果を図 12 に示す。図 12 は、各種細胞を投与した場合の腫瘍の大きさの変化を示すグラフである。図 12 のグラフにおいて、横軸は皮下注射後の経過日数であり、縦軸は腫瘍の大きさ (mm^3) である。図 12 のグラフは、SCIDマウス 5 匹を用いて行った実験における平均、及び標準偏差を示す。図 12 に示すように、v3 を投与した群においては、日数の経過とともに腫瘍の大きさは増加した。これに対し、ドミナントネガティブ K Pim-1 である dnp3、dnp4 及び dnp10 を投与した群

においては、投与後 6 日目から腫瘍の大きさが減少した。このことより、ドミナントネガティブ P i m - 1 が腫瘍形成能を欠失していることがわかる。

5 実施例 1 3

実施例 1 1 で用いたマウスについて、皮下注射後 6 日経過したマウスから腫瘍細胞を切除し、P C N A アポトーシス及びタネル染色の免疫組織化学染色を行った。結果を図 1 3 に示す。

図 1 3 において、a は V 3 を皮下注射したマウスの腫瘍細胞の P C N A 染色像であり、b は d n P 4 を皮下注射したマウスの腫瘍細胞の P C N A 染色像であり、c は V 3 を皮下注射したマウスの腫瘍細胞のタネル染色像であり、d は d n P 4 を皮下注射したマウスの腫瘍細胞のタネル染色像である。図 1 3 に示すように、v 3 の P C N A 染色陽性細胞は、d n P 4 の P C N A 染色細胞に比較して優位に多く、逆に、タネル染色陽性細胞は d n P 4 にのみ認められた。

これらの結果より、P i m - 1 の機能が in vivo において脾臓癌の形成に必要であることが示された。

実施例 1 4

Silencer si RNA construction kit (A m b i o n 社製) を用いて、配列番号：9 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号：9 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドとからなる SiRNA、配列番号：1 1 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号：1 2 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドとからなる SiRNA、配列番号：1 3 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドと、配列番号：1 4 で表わされる塩基配列からなるポリヌク

レオチドとからなる SiRNA を作成した（それぞれを、P i m - 1 - R N A S i - 3 7 9、P i m - 1 - R N A S i - 7 8 4 及び P i m - 1 - R N A S i - 8 4 8 とした）。また、コントロールとして、配列番号：1 5 で表わされる塩基配列からなる S i R N A を用いた（これを、G F P - c o n t r o l とした）。P C I - 4 3 細胞（ 2×10^5 細胞）を 6 穴のプレートにまき、1 2 時間インキュベートした。次いで、この細胞にリポフェクタミン 2000（Invitrogen）を用いて SiRNA を導入し、2 4 時間インキュベートし、5 0 μ M のシスプラチンとともに低酸素分圧下、及び正常酸素分圧下にて 4 8 時間培養を行い、実施例 1 と同様に F A C S 解析を行った。

F A C S 解析の結果を図 1 4 に示す。図 1 4 に示すように、コントロールについては、シスプラチンの存在下、正常酸素分圧下で培養することにより、低酸素分圧下に比べ、約 2 倍のアポトーシスが誘導された。これに対し、S i R N A の存在下で培養した場合には、正常酸素分圧下及び低酸素分圧下において差は認められなかった。

実施例 1 5

p T A L - L u c ベクターに c - M y b の結合配列（配列番号：1 6 で表わされる塩基配列を有する、5' - T A A C G G T T - 3'）を 5 個直列に継ぎ、作製した c - M y b ルシフェラーゼ発現ベクターと、p c D N A 3 . 1 に全長の c - M y b を結合した発現ベクターを導入したヒト胎児腎細胞 2 9 3 細胞株に p c D N A 3 . 1 - P i m - 1 発現ベクターと候補となる化合物を混合して、インキュベートした。インキュベートした後、デュアルルシフェラーゼ定量試薬（プロメガ株式会社）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。なお、候補となる化合物としては、実施例 9 で得られたドミナントネガティブ P i m - 1 トランスフェクタ

ントを用いた。

結果は図示しないが、ドミナントネガティブ P i m - 1 トランスフェクタントを混合した時は、ルシフェラーゼ活性が阻害されており、この系によって、P i m - 1 の活性を阻害する化合物を検索することが可能であることが確認された。

以上詳述した通り、低酸素分圧下に曝された種々の癌細胞においては、P i m - 1 の量が増加しており、正常酸素分圧下においては P i m - 1 は分解されていた。ドミナントネガティブ P i m - 1 によって P i m - 1 遺伝子の機能を阻害することにより、抗癌剤耐性が低下し、腫瘍形成能が低下した。

これらのことより、P i m - 1 タンパク質、又は P i m - 1 遺伝子の機能を阻害することにより、癌の治療、アポトーシス誘導、抗癌剤増強効果を発揮することが可能であり、従って、ドミナントネガティブ P i m - 1 及び P i m - 1 の機能を阻害する化合物は癌の治療等に有効である。

請 求 の 範 囲

1. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする、癌の予防・治療剤のスクリー
5 ニング方法。
2. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなる癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット。
3. 請求項 1 に記載のスクリーニング方法又は請求項 2 に記載のスク
10 リーニング用キットを用いて得られる癌の予防・治療剤。
4. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。
5. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチ
15 ド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。
6. 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなる癌の予防・治療剤。
- 20 7. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤。
8. 癌が膵臓癌である、請求項 4 又は 5 に記載の癌の予防・治療剤。
9. 癌が膵臓癌である、請求項 6 に記載の癌の予防・治療剤。
10. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペ
25 チド又はその塩を用いることを特徴とする、アポトーシス誘導剤のスクリーニング方法。

11. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤のスクリーニング用キット。

12. 請求項10に記載のスクリーニング方法又は請求項11に記載のスクリーニング用キットを用いて得られるアポトーシス誘導剤。

13. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤。

14. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩を含有してなるアポトーシス誘導剤。

15. 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなるアポトーシス誘導剤。

16. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシス誘導剤。

17. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を用いることを特徴とする、抗癌剤増強剤のスクリーニング方法。

18. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を含有してなる抗癌剤増強剤のスクリーニング用キット。

19. 請求項17に記載のスクリーニング方法又は請求項18に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる抗癌剤増強剤。

20. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド又はその塩を阻害する化合物又はその塩を含有してなる抗癌剤増

強剤。

21. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩を含有してなる抗癌剤増強剤。

5 22. 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列よりなるポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有してなる抗癌剤増強剤。

23. セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 もしくはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体を含有してなる抗癌剤増強剤。

10 24. 癌が膵臓癌である、請求項 20 又は 21 に記載の癌の予防・治療剤。

25. 癌が膵臓癌である、請求項 22 に記載の癌の予防・治療剤。

26. 以下の (a) 及び (b) のポリヌクレオチドと少なくとも 95 % 以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチド。

15 (a) 配列番号：4 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号：4 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な c D N A であるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な c D N A であるポリヌクレオチド。

20

27. 請求項 26 に記載のポリヌクレオチドを含有する組換ベクター。

25 28. 請求項 27 に記載の発現ベクターを保持する宿主細胞。

29. 請求項 28 に記載の宿主細胞をポリペプチドの発現に適した条

件下で培養し、得られた培養物からポリペプチドを回収する工程を含む、
配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を有するポリペプチド又はその塩の製造方法。

30. 請求項26に記載のポリヌクレオチド、又は請求項28に記載
5 の組換えベクターを含有してなる癌の予防・治療剤。

31. 請求項26に記載のポリヌクレオチド、又は請求項28に記載
の組換えベクターを含有してなるアポトーシス誘導剤。

32. 請求項26に記載のポリヌクレオチド、又は請求項28に記載
の組換えベクターを含有してなる抗癌剤増強剤。

10 33. 哺乳動物に対して、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 も
しくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその
塩、又は上記ペプチド又はその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現
を阻害する化合物又はその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌
の予防・治療方法。

15 34. 哺乳動物に対して、セリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 も
しくはその部分ペプチド又はその塩の活性を阻害する化合物又はその
塩、又は上記ペプチド又はその部分ペプチド又はその塩の遺伝子の発現
を阻害する化合物又はその塩の有効量を投与することを特徴とする、ア
ポトーシス誘導剤。

20 35. 低酸素によって抗癌剤耐性を誘導された固形癌を有する患者の
治療方法であって、

固形癌細胞内のセリン／スレオニンキナーゼ P i m - 1 の発現を抑
制することを特徴とする方法。

36. 固形癌が膵臓癌である、請求項35に記載の方法。

25 37. 低酸素状態によって抗癌剤耐性を誘導された膵臓癌に、ドミナ
ントネガティブ P i m - 1 を導入することを特徴とする、低酸素状態に

における膵臓癌の抗癌剤耐性を減少する方法。

38. ドミナントネガティブ P i m-1 を膵臓癌細胞に導入すること
を特徴とする、膵臓癌細胞の腫瘍形成能を減少する方法。

39. ドミナントネガティブ P i m-1 トランスフェクタントである、
5 固形癌細胞。

40. ドミナントネガティブ P i m-1 トランスフェクタントである、
膵臓管腺癌。

41. セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 の活性を促進又は阻害
する物質をスクリーニングする方法であって、

10 セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 もしくはその部分ペプチド
又はその塩と被検物質とを接触させる工程、

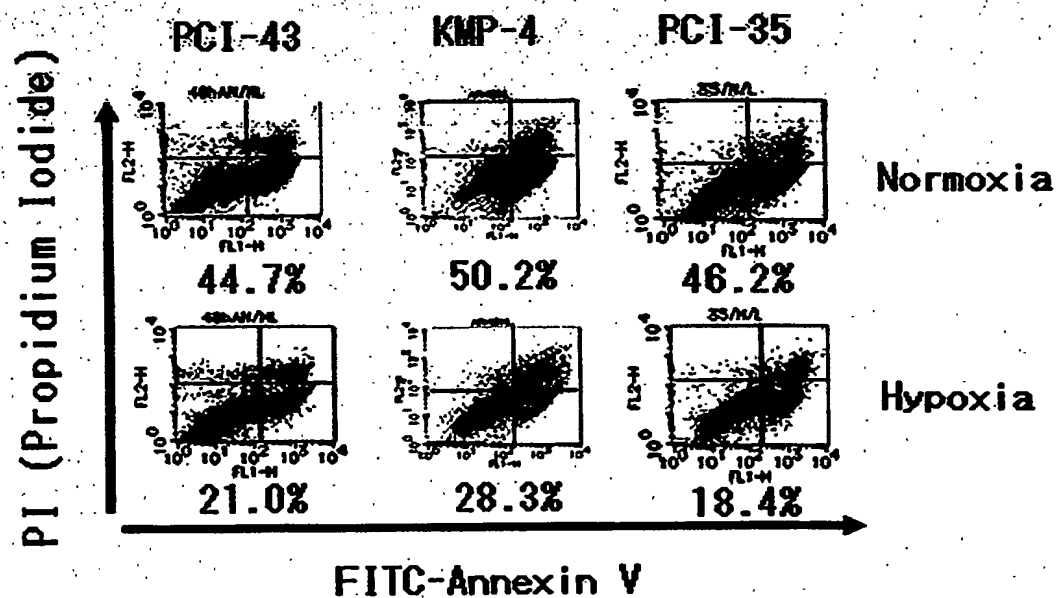
セリン／スレオニンキナーゼ P i m-1 のリン酸化活性を検出する
工程を含む、方法。

42. リン酸化活性の検出を、セリン／スレオニンキナーゼ P i m-
15 1 によってリン酸化される基質の結合に応答して活性化するレポータ
ー遺伝子の発現量の変化を指標として検出する、請求項 41 に記載の方
法。

43. リン酸化活性の検出を、セリン／スレオニンキナーゼ P i m-
1 によってリン酸化される基質のリン酸化された状態を認識する抗体
20 を用いて検出する、請求項 41 に記載の方法。

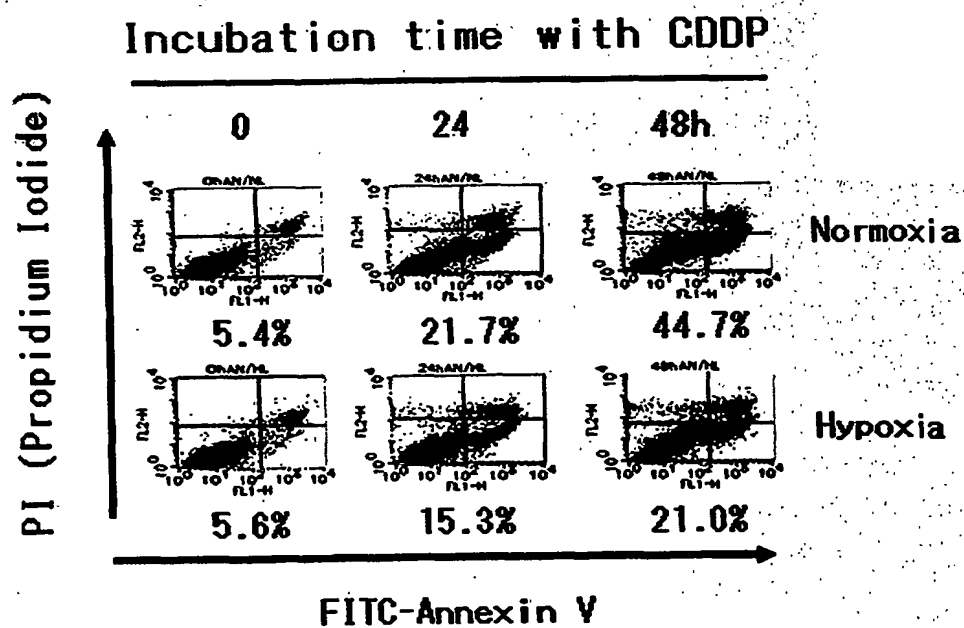
1 / 14

図 1



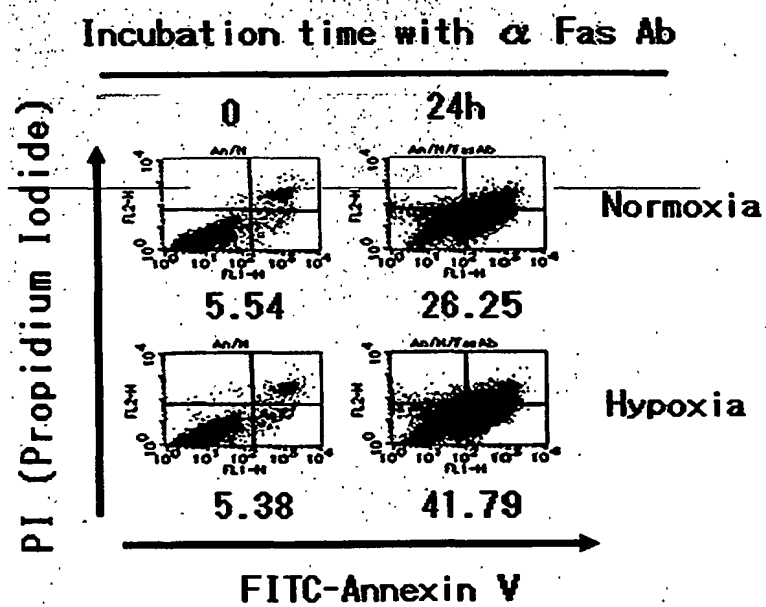
2/14

図 2



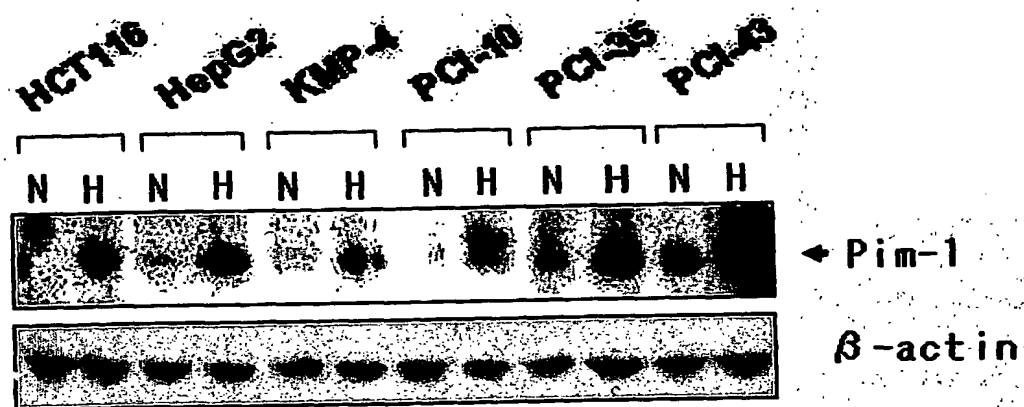
3 / 14

図 3



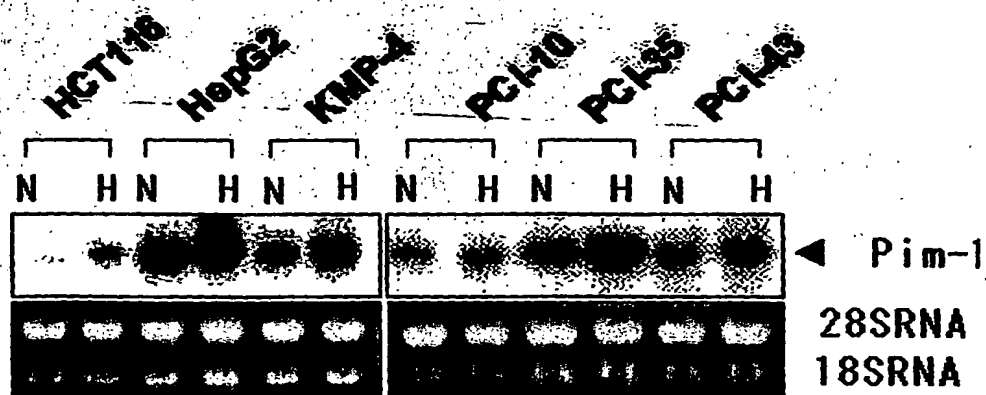
4 / 14

図 4



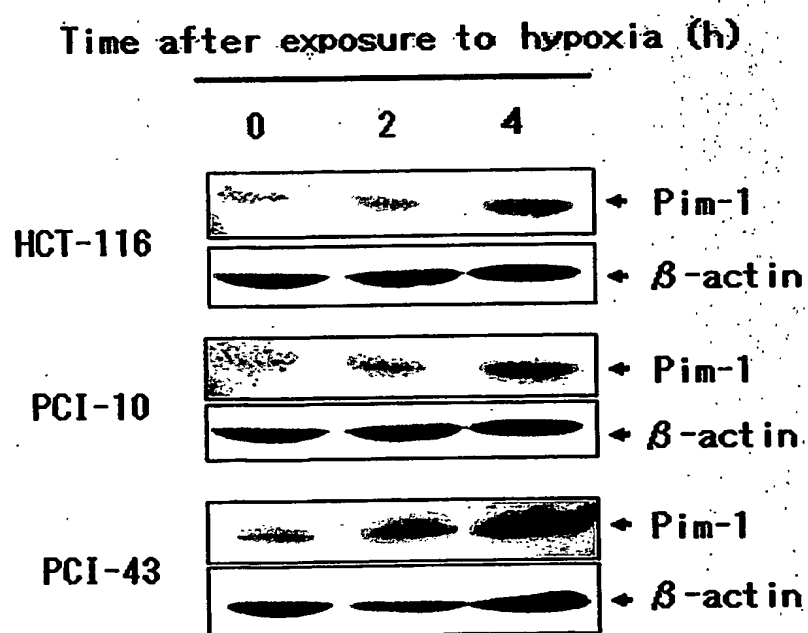
5 / 1 5

図 5



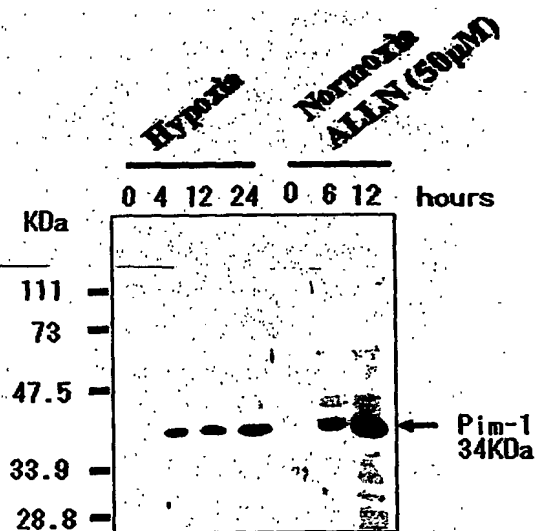
6 / 14

図 6



7 / 14

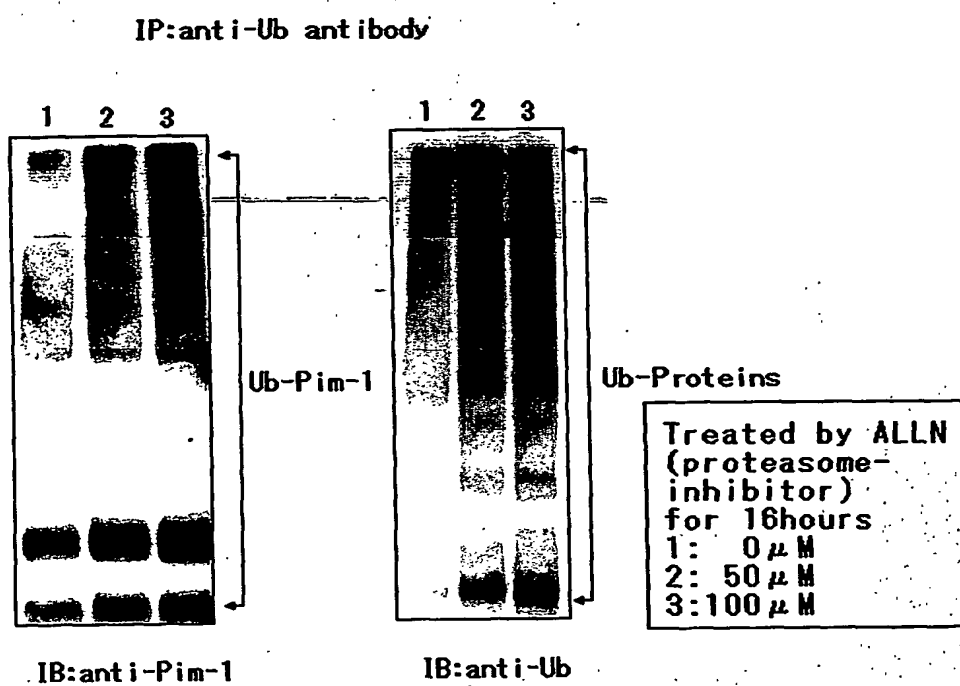
図 7



ALLN: (a calpain inhibitor I)
a inhibitor of proteases and proteasome

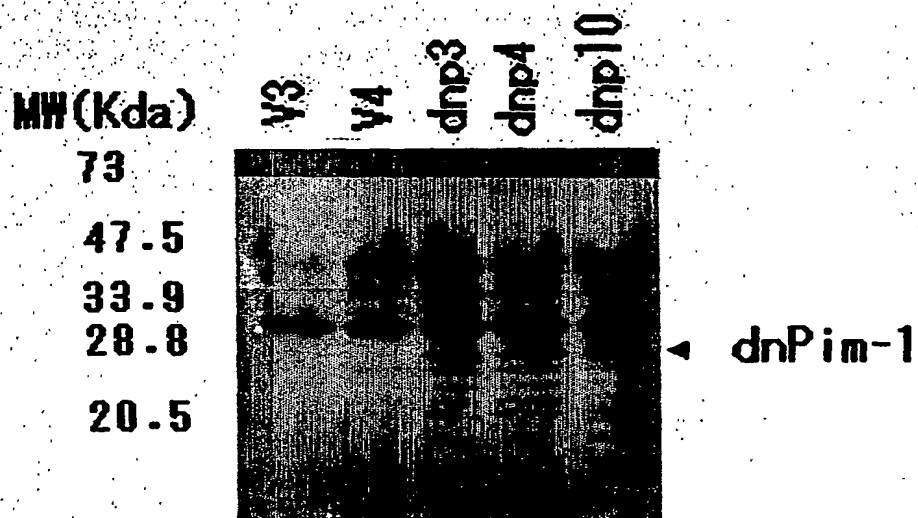
8/14

8



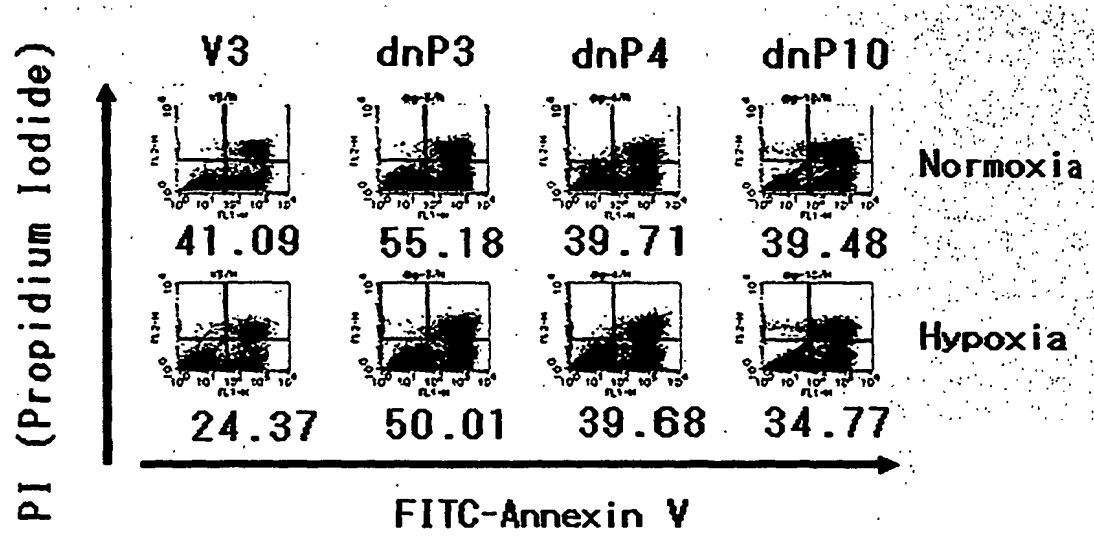
9/14

図 9



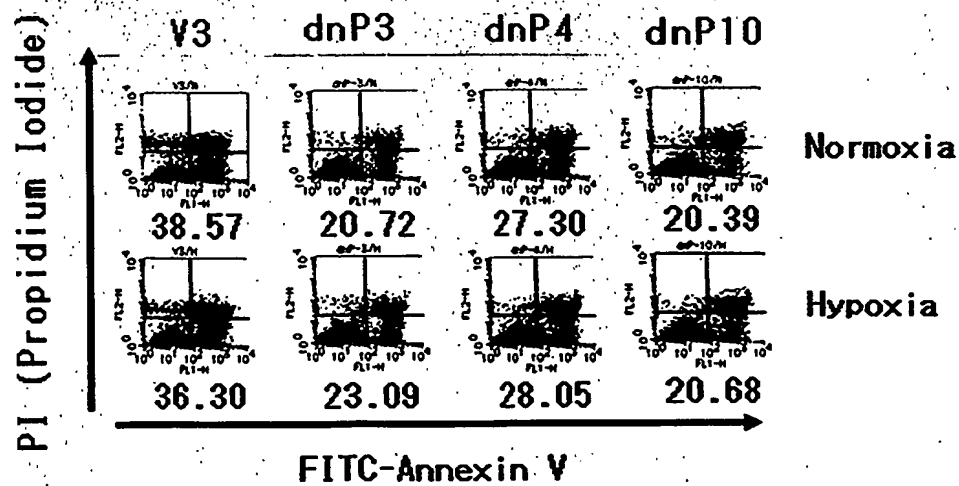
10/14

図 10



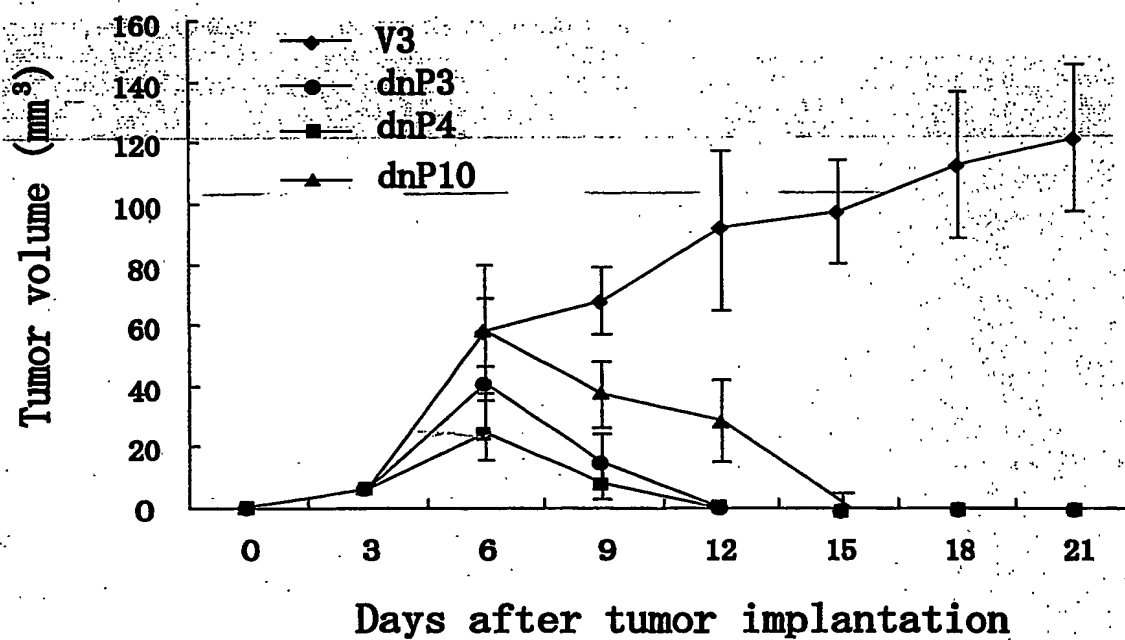
11/14

図 11



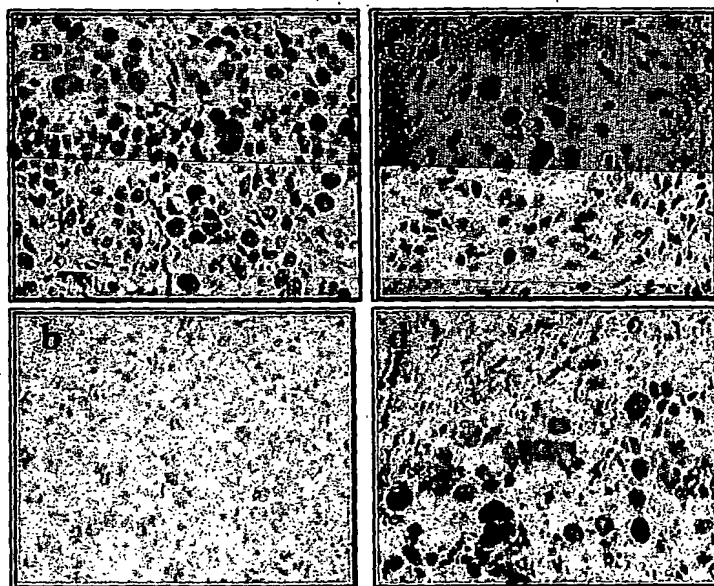
1 2 / 1 4

図 1 2



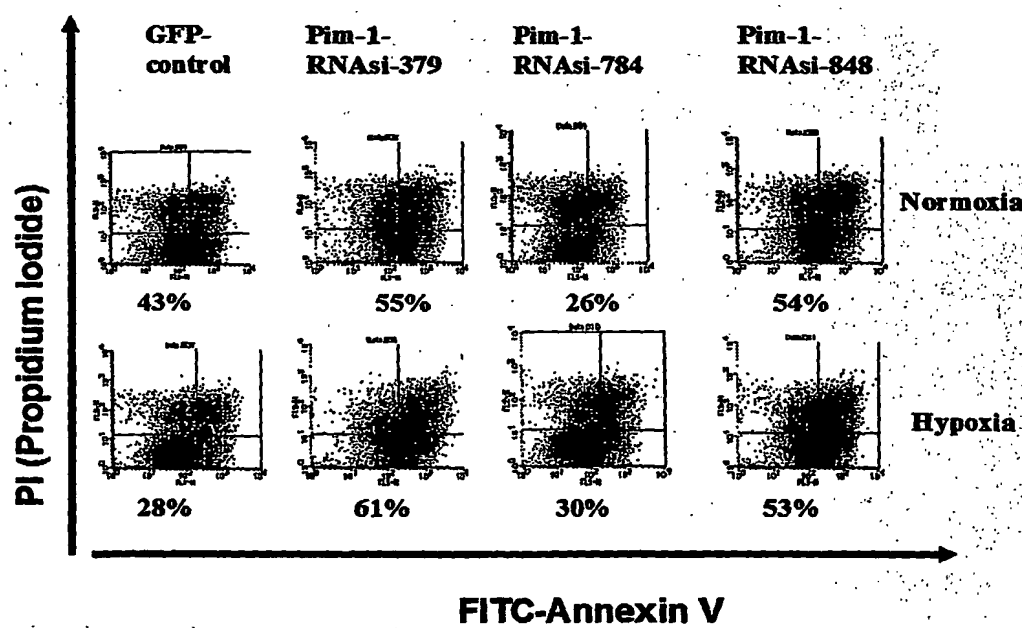
13/14

図 13



14/14

図 14



SEQUENCE LISTING

<110> Hokkaido Technology Licensing Office Co. Ltd.

<120> 医薬品

<130> pctf178

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro

1 5 10 15

Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu

20 25 30

Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly

35 40 45

Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val

50 55 60

Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu

65 70 75 80

Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val
85 90 95

Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg
100 105 110

Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp
115 120 125

Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala
130 135 140

Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn
145 150 155 160

Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp
165 170 175

Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu
180 185 190

Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser
195 200 205

Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala
210 215 220

Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile
225 230 235 240

Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg
245 250 255

Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala
260 265 270

Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro
275 280 285

Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu
290 295 300

His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys
305 310

<210> 2

<211> 942

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctcttgt ccaaaatcaa ctgcttgcc cacctgcgcg ccgcgccctg caacgacctg 60
cacgccacca agctggcgcc cggcaaggag aaggagcccc tggagtcgca gtaccaggtg 120
ggcccgtac tgggcagcgg cggttcggc tcggtctact caggcatccg cgtctccgac 180
aacttgccgg tggccatcaa acacgtggag aaggaccgga tttccgactg gggagagctg 240
cctaattggca ctcgagtgcc catggaagtg gtcctgtga agaaggtgag ctcggttttc 300
tccggcgtca ttaggtctct ggactgggtc gagaggcccg acagtctgt cctgatcctg 360
gagaggcccg agccggtgca agatctcttc gacttcatca cggaaagggg agccctgcaa 420
gaggagctgg cccgcagctt cttctggcag gtgctggagg ccgtgcggca ctgccacaac 480
tgccgggtgc tccaccgga catcaaggac gaaaacatcc ttatcgacct caatcgcggc 540
gagctcaagc tcatcgactt cgggtcgggg gcgctgtca aggacaccgt ctacacggac 600
ttcgatggga cccgagtgt tagccctcca gagtggatcc gctaccatcg ctaccatggc 660
aggctcggcg cagtctggtc cctggggatc ctgctgtatg atatggtgtg tggagatatt 720
cctttcgagc atgacgaaga gatcatcagg ggccaggttt tcttcaggca gaggtctct 780
tcagaatgtc agcatctcat tagatgggtc ttggccctga gaccatcaga taggccaacc 840
ttcgaagaaa tccagaacca tccatggatg caagatgttc tcctgcccc ggaactgtct 900
gagatccacc tccacagcct gtcgcggggg ccagcaaat ag 942

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val
1 5 10 15

Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg
20 25 30

Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp
35 40 45

Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala
50 55 60

Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn
65 70 75 80

Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp
85 90 95

Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu
100 105 110

Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser
115 120 125

Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala
130 135 140

Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile
145 150 155 160

Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg
165 170 175

Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala
 180 185 190

Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro
 195 200 205

Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu
 210 215 220

His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys
 225 230

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cctaattggca ctctgagtgcc catggaagtg gtcctgctga agaaggtgag ctctgggtttc 60
 tccggcgctca ttaggctcct ggactgggtc gagaggcccg acagtttctgt cctgatacctg 120
 gagaggcccg agccgggtgca agatctcttc gacttcatca cggaaagggg agccctgcaa 180
 gaggagctgg cccgcagctt cttctggcag gtgctggagg ccgtgcggca ctgccacaac 240
 tgcgggggtgc tccaccgcga catcaaggac gaaaacatcc ttatcgacct caatcgcggc 300
 gagctcaagc tcatcgactt cgggtcgggg gcgctgctca aggacaccgt ctacacggac 360
 ttcgatggga ccgagtgta tagccctcca gattggatcc gctaccatcg ctaccatggc 420
 aggtcggcgg cagtctggtc cctggggatc ctgctgtatg atatggtgtg tggagatatt 480
 cctttcgagc atgacgaaga gatcatcagg ggccagggtt tcttcaggca gagggtctct 540
 tcagaatgtc agcatctcat tagatgggtg ttggccctga gaccatcaga taggccaacc 600
 ttcgaagaaa tccagaacca tccatggatg caagatgttc tcctgccccca ggaaactgtc 660
 gagatccacc tccacagcct gtcgcccggg cccagcaaat ag 702

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 5

ggttgatgc tctgtccaa

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 6

ccttcagaa gtctctat

19

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 7

gtagaattcg ccaccatgcc tgcctaatgg cactcgagtg

40

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 8

gtactatttg ctgggccccg gcgac

25

<210> 9

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 9

aaugaugaag ucgaagagau ccugucuc

29

<210> 10

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 10

aagaucucu cgacucauc accugucuc

29

<210> 11

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 11

aaaucuaaug agaucugac accugucuc

29

<210> 12

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 12

aaugucagca ucucuuaga uccugucuc

29

<210> 13

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 13

aaauccaugg augguucugg accugucuc

29

<210> 14

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 14

aauccagaac cauccaugga uccugucuc

29

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:short
interference RNA

<400> 15

ggcuacgucc aggagcgcac c

21

<210> 16

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

taacggtt

8

10/10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/48, C12N15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/06,
C12P21/02, C07K14/82, 16/32, G01N33/53, 33/50, 33/15,
A61K38/47, 39/395, 45/00, 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-70, C12N1/00-7/08, 15/00-90, C12P21/00-08,
C07K14/00-16/46, G01N33/53, 33/50, 33/15, A61K38/47,
39/395, 45/00, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z. WANG et al., Pim-1: A serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis., Journal of Veterinary Science, 2001, 2(3), p.167-79	1, 2, 10, 11, 41-43
X	S. VERBEEK, et al., Mice Bearing the Ep-myc and Ep-pim-1 Transgenes Develop Pre-B-Cell Leukemia Prenatally, Molecular and Cellular Biology, 1991, 11(2), p.1176-9	1, 2, 41-43
X	T. MOROY et al., Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1993, 90, p.10734-8	10, 11, 41-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 May, 2004 (14.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R. ZAKUT-HOURI, et al., The cDNA sequence and gene analysis of the human pim oncogene, Gene, 1987, 54, p.105-11	1-32, 34, 39-43
A	S.M. DHANASEKARAN, et al., Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer., NATURE, 2001, 412, p.822-6	1-32, 34, 39-43
T	Meigen TEI, "Teisanso ni yotte Yudo Sareru Pim-1 ha Kokeigan no Yakuzai Teikosei to Seitainai Zoshoku ni Kanyo suru", Hakkaido Igaku Zasshi, 2004, 79(1), pages 19 to 26	1-32, 34, 39-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 33, 35-38

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The methods according to the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: (See below)

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Parts of claims 1 to 32, 34 and 39 to 43 are not clearly described or the inventions according to these claims are neither fully supported by the description nor disclosed by the description in a manner sufficiently clear and complete. Thus, no international search (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

was made thereon.

Claims 1, 2, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 34 and 41
It is unknown the "partial peptide" as described in the above claims means which part. Thus, the inventions according to the above claims are neither fully supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions relating to "partial peptide" which is neither fully disclosed in the description nor clearly and completely disclosed in the description.

Claims 3 to 5, 7 to 9, 12 to 14, 16, 19 to 21, 23 to 25 and 34

Even though EXAMPLES, etc. are examined, nothing but the following compounds (1) and (2) is proved as efficaciously usable as "a preventive/remedy for cancer", "an apoptosis-inducing agent" or "an anticancer agent potentiator". Therefore, it is unknown what compounds other than them are involved in the scopes of the inventions. At the point of the application, there was no common technical knowledge that compounds other than the compounds (1) and (2) are useful as "a preventive/remedy for cancer", "an apoptosis-inducing agent" or "an anticancer agent potentiator".

(1) As a compound inhibiting the activity of Pim-1, a compound relating to dominant negative Pim-1 lacking the Pim-1 kinase activity as shown in EXAMPLE 9. Namely, a polypeptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3, a polynucleotide consisting of a base sequence represented by SEQ ID NO:4, or a recombinant vector containing this polynucleotide.

(2) siRNA shown in EXAMPLE 14 as a compound inhibiting the expression of Pim-1 gene.

Thus, the inventions according to the above claims are neither fully supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions relating to compounds other than the compounds (1) and (2) as described above which are neither fully disclosed in the description nor clearly and completely disclosed in the description.

Claims 6, 15, 22, 26 and 29

The expression "substantially" as used in the above claims makes the claims unclear. Thus, it appears that these claims are not clearly described.

Claims 24 and 25

No "preventive/remedy for cancer" is described in claims 20 and 21 on which the above claims depend. Thus, it appears that these claims are not clearly described.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004917

Claim 26

Since the conditions for "hybridization" in the above claim are unknown, it is unknown what polynucleotides are involved in the scope of the polynucleotide relating to the above claim. Thus, the invention according to the above claim is neither fully supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the invention relating to the polynucleotide which is neither fully disclosed in the description nor clearly and completely disclosed in the description.

Claims 39 and 40

It is unknown what structure the "dominant negative Pim-1" in the above claims has. Even though EXAMPLES, etc. are examined, nothing but a polypeptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 is shown as the "dominant negative Pim-1" and structures other than this compound remain unknown. Thus, the inventions according to the above claims are neither fully supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions relating to compounds other than the polypeptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 which are neither fully disclosed in the description nor clearly and completely disclosed in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q 1/48, C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/06, C12P 21/02, C07K 14/82, 16/32,
G01N 33/53, 33/50, 33/15, A61K 38/47, 39/395, 45/00, 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q 1/00-70, C12N 1/00-7/08, 15/00-90, C12P 21/00-08, C07K 14/00-16/46,
G01N 33/53, 33/50, 33/15, A61K 38/47, 39/395, 45/00, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Z. WANG, et al., Pim-1: A serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis, Journal of Veterinary Science, 2001, 2 (3), p.167-79	1, 2, 10, 11, 41-43
X	S. VERBEEK, et al., Mice Bearing the E μ -myc and E μ -pim-1 Transgenes Develop Pre-B-Cell Leukemia Prenatally, Molecular and Cellular Biology, 1991, 11 (2), p.1176-9	1, 2, 41-43

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 05. 2004

国際調査報告の発送日

01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
阪野 誠司

4N 9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	T. MOROY, et al., Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, p.10734-8	10, 11, 41-43
A	R. ZAKUT-HOURI, et al., The cDNA sequence and gene analysis of the human pim oncogene, Gene, 1987, 54, p.105-11	1-32, 34, 39-43
A	S. M. DHANASEKARAN, et al., Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer, NATURE, 2001, 412, p.822-6	1-32, 34, 39-43
T	鄭明源, 低酸素によって誘導されるPim-1は固形癌の薬剤抵抗性と生体内増殖に関与する, 北海道医学雑誌, 2004, 79 (1), p.19-26	1-32, 34, 39-43

第I欄 .ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 33, 35-38 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲に係る方法は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 (下記参照) は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1-32, 34, 39-43の一部は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、該請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。理由は特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1、2、4、5、7、10、11、13、14、16、17、18、20、21、23、34、41

上記請求の範囲における「部分ペプチド」が、どの部分を示しているか不明である。したがって、該請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に開示されておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない「部分ペプチド」に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲3-5、7-9、12-14、16、19-21、23-25、34

実施例等を見ても、「癌の予防・治療剤」、「アポトーシス誘導剤」または「抗癌剤増強剤」として有効に用いることができることが実証されている化合物は、以下(1)、(2)のみであり、これら以外の化合物にどのような化合物が発明の範囲に含まれるか不明であり、また、(1)、(2)に係る化合物以外の化合物が、「癌の予防・治療剤」、「アポトーシス誘導剤」または「抗癌剤増強剤」として有用であるという出願時の技術常識はない。

(1) Pim-1の活性を阻害する化合物として、実施例9で示されたPim-1のキナーゼ活性を欠失したドミナントネガティブPim-1に関するもの。即ち、配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、または、配列番号：4で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド或いは該ポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

(2) Pim-1の遺伝子の発現を阻害する化合物として、実施例14で示されたSiRNA。

したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に開示されておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない上記(1)、(2)以外の化合物に係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲6、15、22、26、29

上記請求の範囲における「実質的に」という記載は、発明の範囲を不明確とするものである。したがって、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

請求の範囲24、25

上記請求の範囲で引用する請求の範囲20及び21には、「癌の予防・治療剤」は記載されておらず、請求の範囲24、25は、明確に記載されているとはいえない。

請求の範囲26

上記請求の範囲における「ハイブリダイズ」の条件が不明であるため、どのようなポリヌクレオチドが上記請求の範囲に係るポリオリゴヌクレオチドに含まれるか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に開示されておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないポリオリゴヌクレオチドに係る発明については、調査を行っていない。

請求の範囲 39、40

上記請求の範囲における「ドミナントネガティブ P i m-1」がどのような構造を有する化合物であるか不明である。実施例等を見ても、「ドミナントネガティブ P i m-1」として示されているものは、配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのみであり、この化合物以外のものについては、どのような構造を有するか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に開示されておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド以外の化合物に係る発明については、調査を行っていない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.